

O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista

Primeira submissão em 03/08/06
Última submissão em 27/11/06
Aceito para publicação em 28/11/06
Publicado em 20/02/07

Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists

Victor Piana de Andrade¹, Isabela Werneck da Cunha², Edaise Maria da Silva³, Fernanda Ayala³, Yukie Sato³, Severino da Silva Ferreira⁴, Carlos Ferreira Nascimento⁴, Fernando Augusto Soares⁵

unitermos	resumo
Tissue microarray	O arranjo em matriz de amostras teciduais, ou <i>tissue microarray</i> (TMA), é uma técnica descrita em 1998 por Kononen <i>et al.</i> com ampla aceitação pela literatura mundial. Com um conceito extremamente simples, trata-se de agrupar um grande número de amostras teciduais em um único bloco de parafina, permitindo o estudo de expressão de marcadores moleculares em larga escala com grande aproveitamento do material arquivado, do tempo e dos custos. Discutimos as vantagens e limitações do método, as estratégias e técnica de construção, as aplicações e dificuldades encontradas para a patologia investigativa nos últimos cinco anos de uso no Hospital do Câncer A. C. Camargo.
Imuno-histoquímica	
Patologia investigativa	
Perfil molecular	

abstract	key words
<i>Tissue microarrays (TMA) is a worldwide well accepted technique described in 1998 by Kononen et al. It uses an extremely simple concept of ordering hundreds of samples in just one paraffin block to evaluate protein expression in large cohorts with great advantages on costs, time and sample saving. We discuss the technique, its advantages and limitations, strategies to construct the receptor block, its usefulness and difficulties experienced in the last five years at Hospital do Cancer A.C. Camargo.</i>	Tissue microarray Immunohistochemistry Investigative pathology Molecular profiling

Introdução

Conceito

O arranjo em matriz de amostras teciduais, ou *tissue microarray* (TMA), é uma técnica descrita em 1998 por Kononen *et al.*⁽⁸⁾ com ampla aceitação pela literatura mundial. Trata-se da construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais ou tumorais obtidos de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais. Os cilindros teciduais ou tumorais

são dispostos no bloco receptor seguindo uma ordem predeterminada.

Aplicações e vantagens do método

Um bloco de parafina contendo amostra de centenas de tumores de modo ordenado é uma poderosa ferramenta para a patologia investigativa aplicada. Com o uso de métodos especiais, como a imuno-histoquímica ou reação de hibridação *in situ* cromogênica (Cish) ou fluorescente (Fish) em uma lâmina obtida do bloco de

1. Médico patologista do Departamento de Anatomia Patológica Hospital do Câncer A. C. Camargo; assessor médico de Anatomia Patológica do Fleury – Centro de Medicina Diagnóstica.
2. Médica patologista do Departamento de Anatomia Patológica Hospital do Câncer A. C. Camargo.
3. Pós-graduanda da Fundação Antônio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo.
4. Técnicos do Laboratório de Patologia Investigativa do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo.
5. Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo; professor-titular da disciplina de Patologia Geral, Departamento de Estomatologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Fousp).
Suporte Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo/Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão (Fapesp/CEPID) 98/14335-2, Fapesp 04/12360-2 e Fapesp 04/15650-1.

TMA, é possível conhecer a expressão de um determinado marcador ou uma determinada amplificação ou translocação cromossômica em centenas de amostras ao custo de uma única reação. Desde sua descrição, crescente utilização do método pode ser demonstrada pelo número de artigos publicados a cada ano, conforme demonstrado na **Tabela 1**.

Entre as várias aplicações do método destacamos:

- avaliação da sensibilidade e da especificidade dos novos anticorpos de imuno-histoquímica ou novas sondas de Fish/Cish desenvolvidos nos laboratórios ou comerciais. É possível, ainda, analisar comparativamente diferentes clones de anticorpos, distintos protocolos de reação ou diferentes sistemas de amplificação;
- pesquisa em larga escala de fatores prognósticos ou preditivos das neoplasias;
- uniformização das reações nos grandes estudos retrospectivos de uma instituição ou estudos colaborativos entre instituições;
- validação ao nível protéico da hiperexpressão ou hipopressão gênica identificada nos estudos feitos pela análise da quantificação do DNA complementar.

O uso do bloco de TMA apresenta múltiplas vantagens em relação ao corte tradicional^(2, 8, 10, 14, 18), entre elas:

- grande economia de reagentes e de tempo para a realização das reações;
- uniformização das reações e facilidade na interpretação comparativa dos casos de uma pesquisa;
- possibilidade de repetição das reações em múltiplos níveis do bloco;
- simplificação do trabalho das linhas de pesquisa pela utilização do bloco em mais de um projeto.

Técnica, infra-estrutura e material necessário

Técnica do TMA

Para a construção de um bloco de TMA seguimos diversos passos até a análise das reações: a seleção dos casos (dos blocos doadores), a escolha da matriz adequada, a seleção da área a ser

representada, a construção do bloco receptor, a obtenção das lâminas e, finalmente, a manutenção dessas para os estudos.

Seleção dos blocos doadores

A escolha dos blocos doadores para um TMA deve preferencialmente atender aos objetivos de uma linha de pesquisa, e não de um projeto único. Isso porque será sempre possível selecionar uma coorte contida dentro do bloco. A construção do bloco é bastante trabalhosa e uma política restritiva durante a seleção dos blocos doadores pode ocasionar grande desperdício de material e tempo.

Um bloco doador deve ser avaliado quanto a quantidade e qualidade de fixação do material através da sua comparação com a lâmina original arquivada. O material não deve ser esgotado com a obtenção do cilindro do TMA para não prejudicar o paciente ou a instituição. Devido às particularidades do bloco de TMA, a má fixação do tecido pode levar à falta de adesão à lâmina do caso isoladamente, mas também ao descolamento de dezenas de casos situados ao seu redor na matriz tecidual^(11, 14, 17).

A qualidade dos informes clinicopatológicos disponíveis no caso é um critério a ser considerado. Embora casos sem informes completos não precisem ser descartados, quando se selecionam casos com bons dados de prontuário clínico, o aproveitamento daquele bloco pode incluir estudos de coorte retrospectivos, e não apenas para análise de expressão protéica comparativa.

A escolha da matriz adequada

A escolha da matriz de construção do bloco depende da relação entre o número e o diâmetro dos cilindros a serem inseridos. Em nosso serviço, temos agulhas com diâmetro interno de 0,6 mm, 1 mm, 1,5 mm e 2 mm.

Usando agulhas de 0,6 mm é possível inserir 500 cilindros em um bloco; com agulhas de 1 mm, cerca de 320 cilindros; com agulhas de 1,5 mm, perto de 120 cilindros; e com agulhas de 2 mm, apenas 80 cilindros. Mais freqüentemente, usamos a agulha de 1 mm por oferecer boa amostragem, facilidade da construção do bloco receptor e menor dano ao bloco doador. A matriz de 0,6 mm é bastante útil para grandes casuísticas, porém o bloco é de construção e interpretação mais trabalhosas. As agulhas são descartáveis e as mais finas,

Tabela 1

Número de trabalhos indexados na língua inglesa contendo a expressão *tissue microarrays* desde a descrição do método

1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
2	20	53	202	371	604	870	1.128

muito frágeis. As matrizes maiores podem ser reservadas para casos em que a amostragem celular é mais difícil, como nos carcinomas mucinosos, bócios colóides ou lesões de difícil localização, como carcinomas intra-epiteliais.

Assim, a construção do bloco deve seguir as seguintes determinações:

- número de casos disponíveis;
- número de áreas a serem amostradas em cada caso;
- diâmetro da agulha mais adequado ao tipo de tecido/neoplasia;
- número total de cilindros a serem inseridos.

Para uma mesma situação é possível admitir mais de uma opção. Por exemplo: um pesquisador com 250 casos pode optar pela realização de apenas um bloco receptor contendo cilindros de 0,6 mm com amostragem de duas áreas, ou um bloco com cilindros de 1 mm amostrados apenas em uma área, ou, ainda, dois blocos de 1 mm com amostragem em duas áreas.

Os mapas da matriz escolhida são estabelecidos com as marcas do equipamento e com distâncias entre os cilindros. Assim, na matriz de 0,6 mm temos minimatrizes de 25 casos, com separação de 0,2 mm entre elas. Os cilindros são separados por espaços de 0,1 mm. Já nas demais matrizes não há separação em minimatrizes, simplesmente se distanciando cada cilindro em 0,2 mm. O pesquisador pode construir minimatrizes com a separação dos casos de acordo com o seu interesse e para a facilitação da interpretação dos resultados. Na **Figura 1A** podemos ver o exemplo de um bloco construído em uma matriz de 1 mm, com diversas minimatrizes que separam os componentes histológicos do tumor de Wilms, restos nefrogênicos e parênquima renal normal. Na **Figura 1B** temos um exemplo de outro bloco construído em matriz de 0,6 mm subdividido em minimatrizes que incluem os diferentes tipos histológicos dos tumores, neoplasias intra-epiteliais, metaplasias e gastrites.

Seleção das áreas a serem representadas

Cortes histológicos novos obtidos dos blocos doadores devem ser analisados para se avaliar a exata representação do tecido/neoplasia residual no bloco doador e a manutenção de um corte histológico nos arquivos da pesquisa sem retirar a lâmina original do arquivo do serviço. Nessa lâmina nova seleciona-se a área a ser representada no TMA com uma caneta permanente (**Figura 2**).

Uma vez desenhada a área de interesse na lâmina, processo semelhante deve ser feito no bloco de parafina, o que

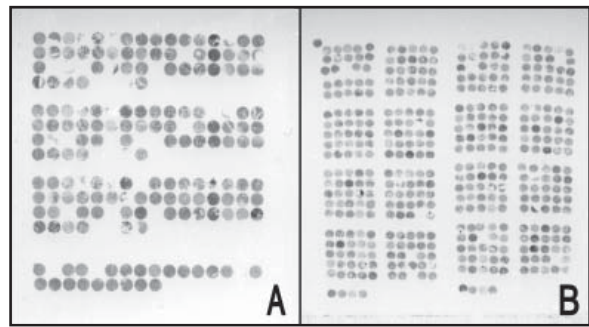


Figura 1 – Detalhe da lâmina corada por hematoxilina e eosina (HE) obtida a partir dos blocos receptores. A: construído com amostras de 1 mm e espaçamento de 0,2 mm. Os casos foram divididos em minimatrizes que separam os componentes histológicos do tumor de Wilms, restos nefrogênicos e parênquima renal normal. B: construído com amostras de 0,6 mm e espaçamento de 0,1 mm. Os casos foram divididos em minimatrizes de 25 casos separadas por 0,8 mm, incluindo os tipos histológicos dos carcinomas gástricos, neoplasias intra-epiteliais, metaplasias e gastrites



Figura 2 – Esquerda: lâmina obtida a partir do bloco original, com a área selecionada para a doação ao bloco receptor. As marcas podem ser amplas ou pontuais para orientar o técnico na obtenção do cilindro. Direita: lâmina obtida a partir do bloco doador após a retirada de dois cilindros de 1 mm cada para o controle de qualidade da área amostrada. Os números no extremo inferior da lâmina se referem à ordem do caso no bloco receptor

facilita o preparo e a velocidade da construção do TMA.

Se diversas áreas precisam ser selecionadas, um código de cores nas marcações pode ser utilizado. A obtenção de uma nova lâmina após a coleta do cilindro para o TMA como controle de qualidade permite verificar a ausência da área amostrada no bloco doador (Figura 2).

Construção do bloco receptor

Esta fase é muito técnica e dependente de máxima concentração e paciência, pois enganos ocorridos são dificilmente identificados *a posteriori*.

O ambiente de trabalho deve ser bem iluminado, tranquilo e com espaço suficiente para que todos os blocos

constantes da matriz sejam organizados na ordem que deverão estar dispostos no bloco receptor.

Há poucas máquinas para a construção de TMA. Basicamente, o mercado oferece dois fabricantes de *arrayers*. A pioneira desses aparelhos foi a Beecher Instruments Inc., que os desenvolveu com o apoio do National Institute of Health (NIH) em Bethesda. O modelo manual inicialmente desenvolvido oferece preço acessível e facilidade de manuseio e manutenção. Esse mesmo fabricante oferece um outro modelo, cuja única vantagem é a possibilidade de trabalho com quatro plataformas de blocos receptores simultaneamente. A desvantagem é o preço substancialmente mais alto.

Os modelos semi-automatizados acrescentam poucas facilidades ao modelo manual, com grande desvantagem no preço. Outro fabricante, Chemicon International Inc., acoplou um microscópio ótico ao *arrayer* para permitir a análise da lâmina ao mesmo tempo em que se obtém o cilindro do bloco correspondente. Na **Figura 3** podemos ver exemplos de blocos de parafina construídos com as diferentes agulhas.

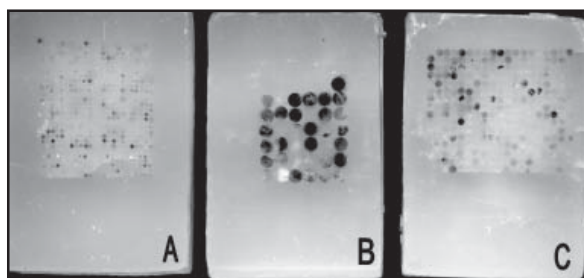


Figura 3 – Blocos receptores construídos com cilindros de calibres diferentes. A: 0,6 mm; B: 2 mm e C: 1 mm

Em um país criativo como o nosso, nossos patologistas inventaram modelos manuais alternativos bastante interessantes e de baixo custo. Recentemente, essas alternativas foram apresentadas no Congresso Brasileiro de Patologia^(1, 13, 15, 16). Um deles utiliza mini-retíficas comerciais acopladas a agulhas grossas de biópsias e outro usa material de máquinas de costura overlock. Essas são alternativas extremamente interessantes e baratas, e que podem ser usadas satisfatoriamente para muitos projetos.

Obtenção das lâminas

Para melhor aproveitamento do bloco receptor é necessário obter todos os cortes histológicos de uma só vez em lâminas seqüenciais numeradas, sem descarte dos níveis intermediários. Usualmente são obtidas cerca de cem lâminas seqüenciais. O grau de perda dos cilindros e as estruturas amostradas devem ser verificados em níveis intervalados

com a coloração de hematoxilina e eosina (H-E). De acordo com a literatura, o bloco é útil enquanto as perdas das amostras forem menores que 20%(3, 7, 14, 17), e excelentes os cortes com 95% de aproveitamento. Pode-se construir um gráfico de aproveitamento, apontando-o a cada nível a fim de determinar o uso dos melhores cortes.

Os cortes são feitos em micrótomo manual e há diferenças importantes em relação à microtomia rotineira. O uso de banho-maria pode ser problemático, pois, com a expansão da parafina, os cilindros podem ficar desalinhados. Por esse motivo utilizam-se lâminas adesivas especiais, fabricadas pela Instrumedics Inc. Os cortes são colhidos em fita adesiva e aplicados nessas lâminas. Por último, a fita adesiva é retirada pela exposição à luz ultravioleta cedida pelo próprio fabricante.

O uso dessa fita adesiva agrega certas desvantagens, como um aumento discreto do *background* da reação imuno-histoquímica e maior custo. Nos casos em que o adesivo não é completamente removido, também há prejuízo da reação imuno-histoquímica. O uso dessas lâminas para hibridação *in situ*, seja fluorescente ou cromogênica, não é aconselhável, sendo para tal importante a coleta de alguns cortes da maneira tradicional.

Como todas as lâminas são colhidas a um só tempo, é muito importante a manutenção dos cortes no sentido de preservar reatividade antigênica. É fato conhecido que os cortes colhidos em lâminas perdem rapidamente sua competência para reações de imuno-histoquímica e hibridação *in situ*. Isso ocorre devido à oxidação causada pelo contato com o oxigênio. Portanto deve-se evitar a exposição do bloco com o ar ambiente. De forma ideal, as lâminas e blocos devem ser armazenados cobertos por parafina, embalados a vácuo e congelados em *freezer* a -20°C.

Há no mercado microscópios robotizados equipados com *softwares* analisadores de imagem que inserem automaticamente a informação obtida em planilhas ordenadas segundo a matriz do projeto.

Limitações na representação histológica

A maior preocupação dos críticos na utilização do TMA é a representação da lesão, considerando a pequena amostra estudada. A fidelidade dos resultados em relação ao uso dos cortes convencionais foi objeto de estudo por ocasião da validação do método e está demonstrada em vários trabalhos da literatura^(4-7, 9-12, 16, 17, 19). As lâminas convencionais também são amostras selecionadas a partir do exame macroscópico, e, mesmo que todo o tumor tenha sido incluído em parafina, não o examinaremos por completo. Podemos exemplificar considerando um tumor esférico de 2 cm de diâmetro e

tomado apenas um corte de 1 cm² por 4 µm de espessura. O tumor tem o volume de 8 cm³, enquanto o corte analisa apenas 0,004 cm³, ou seja, 0,0005% do tumor. Por outro lado, se analisarmos nas lâminas de TMA amostras de tecido de 1 mm de diâmetro, estaremos fazendo cem vezes menos, portanto 0,00004 cm³. A importância da seleção das áreas para o TMA pode ser comparada à da seleção das áreas na macroscopia para a rotina diagnóstica em patologia. Em tumores heterogêneos, analisar áreas centrais e periféricas com alta densidade de células tumorais e diferentes aspectos morfológicos, ainda que sejam pequenas como 0,6 cm de diâmetro, é mais informativo que uma grande área desmoplásica ou necrótica^(2, 3, 8, 16, 18, 19).

Sapino *et al.* demonstraram, em 2006, que a metodologia TMA é aplicável à rotina da pesquisa de fatores prognósticos do câncer de mama através da amostragem de quatro áreas, incluindo regiões centrais e periféricas do tumor. Esses autores obtiveram alta concordância nos resultados com os cortes convencionais, custo sete vezes menor e, portanto, recomendam o uso de TMA na rotina de imuno-histoquímica e Fish dos laboratórios com alto fluxo de carcinomas da mama⁽¹⁶⁾.

Não é aumentando o diâmetro do cilindro que se obtém maior representatividade, mas, sim, com a inclusão de cilindros de áreas tumorais diferentes. Além disso, com a utilização do TMA podemos analisar lâminas obtidas com diferentes níveis de profundidade no bloco. Um bloco de TMA pode dar origem a até 200 lâminas, na dependência da profundidade dos cilindros nele contidos. Se considerarmos lâminas cortadas com 5 µm e utilizarmos um marcador com 40 níveis de diferença, estaremos com 200 µm de distância entre os níveis e nenhuma célula presente no corte 1 estará representada no corte 40. Essa avaliação em dois níveis pode fornecer melhor representação do tumor que um único corte original^(4, 11).

Considerações finais

Em resumo, defendemos o uso do TMA em relação aos cortes convencionais pelas seguintes razões:

- representatividade eficiente através da utilização de diferentes áreas dos tumores e distintos níveis de corte;
- possibilidade de repetição dos experimentos;
- estudo de grande número de amostras simultaneamente;
- grande economia de tempo e custos;
- uniformização das reações.

A organização de um banco de lâminas ou dados obtidos a partir de blocos de TMA é uma arma de investigação poderosa. Um bloco de TMA deve servir a diversos projetos institucionais ou multiinstitucionais e os resultados obtidos, armazenados de forma centralizada para que as pesquisas não se repitam. O melhor controle de qualidade de uma unidade de TMA é o número de publicações que decorre do seu uso.

Entendemos que a unidade de TMA não deve funcionar com uma ferramenta que atenda a instituição como um todo com desdobramentos para projetos cooperativos multiinstitucionais. Assim, temos agido, desde a implantação, colaborando com diversas instituições de ensino e pesquisa na organização dos blocos TMA dos projetos aprovados pelas comissões de ética e de pesquisa.

Nesta revisão, tentamos transmitir a experiência adquirida de utilização do TMA nestes anos no sentido de facilitar a instalação dessa metodologia pelo nosso país. A experiência adquirida está à disposição para troca de idéias e auxílio no que for pertinente para o incremento da qualidade da pesquisa em patologia realizada no Brasil.

Referências

1. ANDRADE, V. et al. Método alternativo para construção de *tissue microarrays* de baixa densidade e baixo custo. *J Bras Patol Med Lab*, v. 41, n. 3, p. 109, 2005.
2. BUBENDORF, L. et al. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J. Natl Cancer Inst*, v. 91, n. 20, p. 1758-64, 1999.
3. BUBENDORF, L. et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res*, v. 59, n. 4, p. 803-6, 1999.
4. CAMP, R. L. et al. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, v. 80, n. 12, p. 1943-9, 2000.
5. ENGELLAU, J. et al. Tissue microarray technique in soft tissue sarcoma: immunohistochemical Ki-67 expression in malignant fibrous histiocytoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, v. 9, n. 4, p. 358-63, 2001.
6. HENDRIKS, Y. et al. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol*, v. 162, n. 2, p. 469-77, 2003.

7. HOOS, A. et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol*, v. 158, n. 4, p. 1245-51, 2001.
8. KONONEN, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, v. 4, n. 7, p. 844-7, 1998.
9. MILANES-YEARSLEY, M. et al. Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol*, v. 15, n. 12, p. 1366-73, 2002.
10. MOCH, H. et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, v. 154, n. 4, p. 981-6, 1999.
11. MUCCI, N. R. et al. Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol*, v. 31, n. 4, p. 406-14, 2000.
12. NOCITO, A. et al. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol*, v. 194, n. 3, p. 349-57, 2001.
13. PIRES, A. et al. Democratizando o tissue microarray. *J Bras Patol Med Lab*, v. 41, n. 3, p. 141, 2005.
14. RICHTER, J. et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in urinary bladder cancer. *Am J Pathol*, v. 157, n. 3, p. 787-94, 2000.
15. ROCHA, R. et al. Construção de *arrays* artesanais de tecido e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico (IHQ) de tumores mamários. *J Bras Patol Med Lab*, v. 41, n. 3, p. 51, 2005.
16. ROCHA, R. M. et al. Construção de *arrays* de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. *JBPML*, v. 42, n. 6, p. 477-82, 2006.
17. SAPINO A. et al. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch*, v. 449, n. 3, p. 288-96, 2006.
18. SCHRAML, P. et al. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res*, v. 5, n. 8, p. 1966-75, 1999.
19. SIMON, R. et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, v. 93, n. 15, p. 1141-6, 2001.
20. TORHORST, J. et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, v. 159, n. 6, p. 2249-56, 2001.

Endereço para correspondência

Fernando Augusto Soares
Depto. de Anatomia Patológica do Hospital do
Câncer A. C. Camargo
Rua Antônio Prudente, 109 - 1º andar - Prédio
Novo - Liberdade
CEP: 01509-010 - São Paulo-SP
Tel./Fax.: (11) 2189-5185
e-mail: fasoares@hcancer.org.br